

CLÁUDIA HELENA DEGÁSPARI

**PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES E
ANTIMICROBIANAS DOS FRUTOS DA AROEIRA
(*Schinus terebenthifolius* Raddi).**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação ao nível de Doutorado para o Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Setor de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná.

CURITIBA
2004

Andar com fé eu vou, que a fé não costuma falhar...

Gilberto Passos Gil Moreira

A Deus Pai, todo poderoso, Criador do céu e da terra.

AGRADECIMENTOS

- Ao meu marido João, por ser fiel na alegria e na tristeza;
- Aos meus pais, por todo amor;
- À minha orientadora, pelas trocas de idéias ao longo do trabalho;
- Aos técnicos de laboratório da Universidade Tuiuti do Paraná: Bruno, Carlos, Letícia e Simone, pela importante ajuda;
- Ao Prof. Dr. Olavo Araujo Guimarães da Faculdade de Ciências Biológicas da UFPR, por me ajudar a identificar corretamente a espécie de aroeira que eu havia escolhido para este trabalho;
- Ao Ricardo José dos Santos e à Profa. Dra. Maria Inés Genovese da Faculdade de Farmácia da USP, por toda disponibilização de equipamentos e métodos;
- Ao Fabio, por me ajudar a colher alguns frutos no meio do trânsito do meio dia;
- À Dra. Marcia Regina Beux do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos da UFPR, por todas as cepas de microrganismos;
- À colega Maria Rosa Machado Prado, pelo apoio técnico.
- À Freya, por me fazer acreditar que eu conseguiria terminar este trabalho;
- À Giovanna, por conseguir rapidamente as bibliografias necessárias;
- Ao Binho, por me ajudar com as referências bibliográficas;
- Ao Prof. Dr. Guilherme Lanzi Sassaki Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR, por me ajudar a liofilizar as amostras;
- Ao Prof. Carlos André Domingues Fernandes pelas importantes trocas de idéias.

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES	ix
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
INTRODUÇÃO	1
OBJETIVO	3
JUSTIFICATIVA	3
REFERÊNCIAS	3
CAPÍTULO I - CARACTERIZAÇÃO BOTÂNICA DA AROEIRA	5
REFERÊNCIAS	11
CAPÍTULO II - PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES DE COMPOSTOS FENÓLICOS	13
1 INTRODUÇÃO	13
2 RADICAIS LIVRES E AS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO	14
3 OXIDAÇÃO DE LIPÍDIOS	15
4 COMPOSTOS ANTIOXIDANTES	18
5 COMPOSTOS ANTIOXIDANTES ARTIFICIAIS	20
6 COMPOSTOS ANTIOXIDANTES NATURAIS	21
7 COMPOSTOS FENÓLICOS DE FONTES VEGETAIS	23
8 COMPOSTOS FENÓLICOS TIPO FLAVONÓIDES	25
8.1 ANTOCIANINAS	29
8.2 ANTOXANTINAS	29
9 COMPOSTOS FENÓLICOS TIPO NÃO FLAVONÓIDES	31
10 TOCOFERÓIS	32
REFERÊNCIAS	34
CAPÍTULO III – PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS DE COMPOSTOS ORGÂNICOS.....	41
1 DESENVOLVIMENTO MICROBIANO EM ALIMENTOS	41

1.1 INTRODUÇÃO	41
1.1.1 Temperatura	41
1.1.2 Atmosfera	42
1.1.3 pH	43
1.1.4 Atividade de Água	44
1.2 SUBSTÂNCIAS COM AÇÃO ANTIMICROBIANA	44
1.3 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA EM PRODUTOS ALIMENTÍCIOS	48
REFERÊNCIAS	54
CAPÍTULO IV – MÉTODOS PARA OBTENÇÃO DE EXTRATOS	
VEGETAIS	57
1 INTRODUÇÃO	57
2 COLHEITA DA AMOSTRA E ARMAZENAMENTO	58
3 EXTRAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS COM PRINCÍPIO	
ATIVO	59
4 PREPARO DO EXTRATO PARA ARMAZENAGEM	63
5 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA	64
5.1 DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS	67
5.2 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS	
FENÓLICOS	68
5.3 DETERMINAÇÃO DE ÍNDICE DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	72
6 TESTES MICROBIOLÓGICOS	73
6.1 CEPAS EMPREGADAS	73
6.1.1 <i>Aspergillus niger</i>	74
6.1.2 <i>Candida albicans</i>	75
6.1.3 <i>Bacillus cereus</i>	75
6.1.4 <i>Escherichia coli</i>	76
6.1.5 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	76
6.1.6 <i>Salmonella choleraesuis</i>	77
6.1.7 <i>Staphylococcus aureus</i>	77
6.2 METODOLOGIA APLICADA NOS TESTES MICROBIOLÓGICOS	78
REFERÊNCIAS	81

CAPÍTULO V – MATERIAL, MÉTODOS, RESULTADOS E DISCUSSÃO..	87
1 OBTENÇÃO DO EXTRATO VEGETAL	87
1.1 COLHEITA DO MATERIAL	87
1.2 EXTRAÇÃO DOS PRINCÍPIOS ATIVOS	87
1.3 PREPARO DO EXTRATO	88
2 TESTES FÍSICO-QUÍMICOS	89
2.1 DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS	89
2.2 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS	89
2.3 DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	90
3 TESTES MICROBIOLÓGICOS	90
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	91
5 CONCLUSÃO	101
6 SUGESTÃO.....	102
REFERÊNCIAS	102

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I - CARACTERIZAÇÃO BOTÂNICA DA AROEIRA

Figura 01 – Cacho com os frutos da <i>Schinus terebenthifolius</i> Raddi	7
Figura 02 – <i>Schinus terebenthifolius</i> Raddi frutificando situada em latitude sul 25° 25' 36,8" , longitude oeste 49° 17' 51,0" e altitude de 892 metros na cidade de Curitiba – PR	7

CAPÍTULO II - PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES DE COMPOSTOS FENÓLICOS

Figura 01 – Espécies reativas de oxigênio ou ROS	15
Figura 02 – Estruturas químicas básicas do núcleo flavan e do núcleo 4-oxo-flavonóide	26
Figura 03 – Estruturas químicas básicas dos principais flavonóides	27
Figura 04 – Estruturas químicas básica dos taninos hidrolisáveis	28
Figura 05 – Compostos fenólicos tipo não flavonóides	32
Figura 06 – Estrutura química dos principais tocoferóis encontrados na natureza	34

CAPÍTULO IV – MÉTODOS PARA OBTENÇÃO DE EXTRATOS VEGETAIS

Figura 01 – Fluxograma da metodologia aplicada para obtenção de extratos vegetais	56
---	----

CAPÍTULO VI – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Figura 01 – Análise pelo HPLC do extrato alcoólico dos frutos da <i>Schinus terebenthifolius</i> Raddi	96
Figura 02 – Análise pelo HPLC do extrato aquoso dos frutos da <i>Schinus terebenthifolius</i> Raddi	97
Figura 03 – Placas de Petri com os halos de inibição do crescimento microbiano do <i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778 frente a discos impregnados com extrato alcoólico (E), extrato aquoso (A) e diluente metanol (M)	98
Figura 04 – Placas de Petri com os halos de inibição do crescimento microbiano do <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 frente a discos impregnados com extrato alcoólico (E), extrato aquoso (A) e diluente metanol (M)	99

LISTA DE QUADROS

CAPÍTULO II - PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES DE COMPOSTOS FENÓLICOS

Quadro 01 – Classificação dos flavonóides de acordo com as nuances de cor, sugrupos e principais compostos	26
--	----

CAPÍTULO III – PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS DE COMPOSTOS FENÓLICOS

Quadro 01 – Substâncias químicas com ação negativa sobre o crescimento microbiano	46
Quadro 02 - Efeitos antibacterianos de compostos fenólicos em amostras de 500 µg feitas em triplicata	49
Quadro 03 - Efeitos antifúngicos de compostos fenólicos em amostras de 500 µg feitas em triplicata	50
Quadro 04 - Efeitos antimicrobianos de extratos de plantas em amostras de 500 µg feitas em triplicata	51

CAPÍTULO IV – MÉTODOS PARA OBTENÇÃO DE EXTRATOS VEGETAIS

Quadro 01 – Padrões de compostos fenólicos utilizados nos diversos trabalhos consultados	69
--	----

CAPÍTULO V - MATERIAIS, MÉTODOS E RESULTADOS

Quadro 01 – Comparação entre o teor de compostos fenólicos de diversas fontes com a aroeira.....	93
Quadro 02 – Resultados da atividade antioxidante dos extratos dos frutos da <i>Schinus terebenthifolius</i> Raddi comparativamente ao BHT e BHA	94
Quadro 03 – Resultados do teste de resistência a diversos antibióticos pelas cepas bacterianas testadas	100

LISTA DE ABREVIATURAS

BHA	-	Butil hidroxi anisol
BHT	-	Butil hidroxi tolueno
CEPPA	-	Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos
DNA	-	Ácido desoxi ribonucléico
DPPH	-	2,2-di(4-terci-octilfenil)-1-picrilhidrazil.
EEC	-	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica
EHEC	-	<i>Escherichia coli</i> entero-hemorrágica
HPLC	-	Cromatografia líquida de alta performance
IC50	-	Concentração de inibição de 50% da reação
IR	-	Infra-vermelho
LDL	-	Lipoproteína de baixa densidade
ORAC	-	Capacidade de absorbância do radical oxigênio
ppm	-	Partes por milhão
R ²	-	Raio de correlação
ROS	-	Espécies reativas de oxigênio
SLTs	-	“ <i>Shiga-like</i> ” toxinas
t-BHQ	-	<i>t</i> -butil-hidroquinona
UFMG	-	Universidade Federal de Minas Gerais
UFPR	-	Universidade Federal do Paraná
UNESP	-	Universidade Federal Paulista
USP	-	Universidade de São Paulo
UFC	-	Unidades formadoras de colônia
UV	-	Ultra-violeta
VTs	-	Verotoxinas
VLDL		Lipoproteína de muito baixa densidade

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo analisar a atividade antioxidante e antimicrobiana de extratos aquoso e alcoólico obtidos a partir dos frutos da *Schinus terebenthifolius* Raddi ou aroeira-vermelha, diretamente ligados à quantidade de compostos fenólicos existentes nestes extratos. Os frutos da aroeira apresentam um teor intermediário de compostos fenólicos: inferior ao morango, porém superior a grãos, sendo de 88 µg de catequina/ g de amostra base seca para o extrato obtido pela extração em água quente (extrato aquoso) e 685 µg de catequina/ g de amostra base seca para o extrato obtido pela extração em etanol absoluto (extrato alcoólico). O extrato alcoólico apresentou a flavona apigenina, além de ácido elágico. Já o extrato aquoso apresentou a flavanona naringina. Quanto ao seu poder antioxidante, pode-se concluir que os poderes antioxidantes de ambos os extratos apresentam bom potencial de aplicação, quando se compara aos comumente empregados BHT (butil-hidroxitolueno) e BHA (butil-hidroxianisol), visto que se trata de extratos vegetais, cujo poder antioxidante é, em geral, mais fraco que os antioxidantes artificiais. O extrato alcoólico, apresentou um poder antioxidante quatro vezes menor que o BHT e o BHA. O extrato aquoso, por sua vez, apresentou um poder antioxidante seis vezes menor que o BHT e o BHA. Com relação à sua ação antimicrobiana, observou-se que o extrato alcoólico apresentou efeito inibitório às cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e de *Bacillus cereus* ATCC 11778, mas sem efeito inibitório para os outros microrganismos testados. O extrato aquoso não apresentou efeito inibitório aos microrganismos testados.

Palavras-chave: Atividade antimicrobiana; atividade antioxidante; aroeira; compostos fenólicos; *Schinus terebenthifolius*.

ABSTRACT

This work had as objective to analyze the antioxidant and antimicrobial activities of aqueous and alcoholic extracts obtained from the *Schinus terebenthifolius* Raddi fruits or aroeira-vermelha, directly linked to the amount of phenolic compounds existent in these extracts. The aroeira fruits present an intermediate quantity of phenolic compounds: inferior to the strawberry, however superior to grains, being of 88 μg of catechine/ g of sample dry base for the extract obtained by the extraction in hot water (aqueous extract) and 685 μg of catechine/ g of sample dry base for the extract obtained by the extraction with absolute ethanol (alcoholic extract). The alcoholic extract was shown with the presence of the flavone apigenin, besides elagic acid, while in the aqueous extract it was observed the flavanone naringine. As for its antioxidant power, it can be concluded that both extracts present good potential for application in proctus, when it is compared to the commonly used BHT (butylated hydroxytoluene) and BHA (butylated hydroxyanisole), because it is vegetable extracts, whose antioxidant power is, in general, weaker than the artificial antioxidants. In the case of the alcoholic extract, the same presented a power antioxidant four times smaller than BHT and BHA. The aqueous extract, for its time, presented a power antioxidant six times smaller than BHT and BHA. Regarding its antimicrobial action, it was observed that the alcoholic extract presented inhibitory effect to *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 and to *Bacillus cereus* ATCC 11778, but without effect inibitório for the other tested microorganisms. The aqueous extract didn't present inhibitory effect to the tested microorganisms.

Key-words: Antimicrobial activity; antioxidant activity; aroeira; phenolic compounds, *Schinus terebenthifolius*.